

2014년 2월
박사학위논문

조골세포 성장과 세포외 기질형성에
미치는 접골목 추출물의 효과

조선대학교 대학원

치의생명공학과

김 정 선

2014년 2월
박사학위논문

조골세포 성장과 세포외 기질형성에
미치는 접골목 추출물의 효과

김 정 선

조골세포 성장과 세포외 기질형성에
미치는 접골목 추출물의 효과

Effect of *Sambucus sieboldiana* extract on the
cell growth and extra cellular matrix
formation in osteoblast cells

2014년 2월 25일

조선대학교 대학원

치의생명공학과

김 정 선

조골세포 성장과 세포외 기질형성에
미치는 접골목 추출물의 효과

지도교수 김 수 관

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함.

2013년 10월

조선대학교 대학원

치의생명공학과

김 정 선

김정선의 박사학위 논문을 인준함

위원장	조선대학교	교수	김재덕	인
위원	조선대학교	교수	김수관	인
위원	경북대학교	교수	권대근	인
위원	조선대학교	교수	김도경	인
위원	조선대학교	교수	전홍성	인

2013년 12월

조선대학교 대학원

목 차

표목차	iii
도목차	iv
ABSTRACT	v
I. 서론	1
II. 실험재료 및 방법	3
1. 실험재료	3
2. 접골목 에탄올 추출	3
3. 세포배양	4
4. MTT 분석에 의한 세포증식 측정	4
5. Von Kossa 염색을 통한 골기질 형성 분석	5
6. 역전사 중합효소연쇄반응 분석	5
7. 정량 PCR 분석	6
8. 실험자료의 통계학적 검정	6

III. 실험결과	9
1. 접골목 추출물에 의한 MC3T3-E1 세포주 증식 효과	9
2. MC3T3-E1 분화과정에서 세포외 기질형성에 미치는 접골목의 효과	9
3. 조골세포주 분화과정에서 분화 특이유전자들의 발현에 미치는 접골목의 효과	10
4. 조골세포주 분화과정에서 정량 PCR에 의한 분화 특이유전자들의 발현분석	11
IV. 총괄 및 고안	12
V. 결론	16
VI. 참고문헌	17
VII. 사진부도 설명	22
VIII. 사진부도	25

표 목 차

Table 1. Primer sequences for PCR	8
---	---

도 목 차

Fig. 1. Microphotographs show MC3T3-E1 mouse osteoblastic cells	25
Fig. 2. Concentration dependent effects of <i>Sambucus sieboldiana</i> on the cell proliferation in MC3T3-E1 mouse osteoblastic cells	26
Fig. 3. Mineralized nodule formation in MC3T3-E1 cells	27
Fig. 4. Effect of <i>Sambucus sieboldiana</i> on alkaline phosphatase (ALP) mRNA expression	28
Fig. 5. Effect of <i>Sambucus sieboldiana</i> on osteonectin (ON) mRNA expression	29
Fig. 6. Effect of <i>Sambucus sieboldiana</i> on osteocalcin (OC) mRNA expression	30
Fig. 7. Effect of <i>Sambucus sieboldiana</i> on OC mRNA expression by real-time quantitative RT-PCR	31

ABSTRACT

Effect of *Sambucus sieboldiana* extract on the cell growth and extra cellular matrix formation in osteoblast cells

Kim, Jung-Sun

Advisor: Prof. Kim, Su-Gwan, D.D.S., Ph.D.

Department of Biodental Engineering,

Graduate School of Chosun University

The bone formation is made by osteoblasts under the control of hormones and by cytokines and local factors residing in the extracellular matrix of bone. The osteoblasts mineralize bone matrix during bone formation and osteoblastic differentiation is an important process of bone formation. Some oriental drugs have useful effects for bone formation in oriental medicine. *Sambucus sieboldiana* is a member of the family Caprifoliaceae and has been recommended as a functional material because of its several bioactivities such as arthritis, lumbago, fracture, traumatic-hemorrhagic and promotion of bone formation. Although numerous literatures are available on the pharmacological and biological activities, the biological activity of *Sambucus sieboldiana* in bone regeneration process has not yet been well defined. In this study, the effect of *Sambucus sieboldiana* was, therefore, investigated in the proliferation and differentiation of MC3T3-E1 osteoblastic cell line.

To determine the characteristic alteration of MC3T3-E1 cells by *Sambucus sieboldiana* in the proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells, it was examined by cell culture, MTT assay, Von Kossa staining, RT-PCR and quantitative real-time PCR analysis in MC3T3-E1 cells. The results are as follows.

1. The treatment of *Sambucus sieboldiana* did not significantly affect the cell proliferation in MC3T3-E1 cells.
2. *Sambucus sieboldiana* significantly accelerated the mineralization as compared with the control culture in the differentiation of MC3T3-E1 cells.
3. *Sambucus sieboldiana* significantly increased the expression of alkaline phosphatase (ALP) mRNA as compared with the control in the differentiation of MC3T3-E1 cells.
4. *Sambucus sieboldiana* significantly accelerated the decrease of osteonectin (ON) mRNA expression as compared with the control in a time-dependent manner in the differentiation of MC3T3-E1 cells.
5. *Sambucus sieboldiana* significantly increased the expression of osteocalcin (OC) mRNA as compared with the control in the differentiation of MC3T3-E1 cells.

These results suggest that the *Sambucus sieboldiana* facilitate the osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 osteoblastic cells, and therefore, that it may have potential properties for development and its clinical application of bone regeneration materials.

KEY WORDS: Bone formation, *Sambucus sieboldiana*, Differentiation, Mineralization, Osteoblasts, Proliferation

I. 서 론

인체는 생명체의 구조적·기능적 기본단위인 세포로 이루어져 있으며 각 세포마다의 성장특징으로 신생과 사멸을 반복하고 있는데, 그 중에서도 평생 동안 재형성되는 골조직과 같은 세포들이 있는 반면 한번 형성되면 다시 생기지 않는 치아의 법랑질 같은 세포들도 있다[1]. 인체의 각 세포와 조직들이 성장하는 양식이 다르며 각 세포들의 성장하고 사멸하기까지의 과정이 점차 밝혀지고 있으나, 아직까지 설명하지 못하고 있는 부분도 많이 존재한다[2-3].

골의 재형성 과정은 기존의 뼈가 새로운 뼈로 전환되는 골 생성 과정으로, 이러한 과정은 증식, 분화 및 세포의 기질의 석회화유도 등의 단계를 거쳐 진행되며, 일반적으로 골 형성과 흡수 과정은 조골세포(osteoblast)와 파골세포(osteoclast)의 상호작용에 의해 균형을 이루면서 뼈의 건강을 유지한다[1]. 그러나 이러한 조골세포와 파골세포의 불균형이 생기면 골다공증과 같은 대사성 골 관련 질환이 유발될 수 있다[4-7]. 고령화 사회로 접어들면서, 노년층 특히 여성에서 여성호르몬 저하에 의한 골다공증 발병 문제가 더욱 부각되고 있다[4,8]. 골다공증 예방 및 치료에 사용되는 치료제는 대부분 골 흡수를 억제하는 작용을 하기 때문에 진행성 골소실은 완전히 회복할 수 없어, 골다공증의 발생을 완전히 예방할 수 없는 것이 현실이며, 따라서 골다공증의 예방과 치료를 위한 골형성 증가에 관련된 몇 종류 천연물의 효능을 근거로 다양한 천연물들의 골조직 재생능력에 미치는 영향 등에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다[9-13].

골형성은 여러 단계의 분자생물학적 과정에 의하여 이루어지며, 골 관련 유전자들의 발현에 의하여 조절된다[1,3]. 골형성 과정의 초기에 교원질이 침착되어 세포의 기질을 형성한 후, 비교원성 단백질을 침착시키고 수산화인회석으로 석회화된다[1,3]. 이 과정에 관여하는 유전자는 세포의 β -glycerophosphate를 분리하는 alkaline

phosphatase(ALP), 석회화를 개시하는 bone sialoprotein(BSP), 교원질 교차결합을 유도하는 procollagenlysl hydroxylase-2(PLOD-2), 석회화 결절형성을 조절하는 osteonectin(ON), osteocalcin(OC) 및 osteopontin(OP) 등이 있다[1,3].

식물성 에스트로겐에는 isoflavone, coumestan, lignan 등이 있으며 이 중 isoflavone은 골대사와 관련하여 활발히 연구가 진행 중인 대표적인 식물성 에스트로겐이다[9,14]. 접골목(*Sambucus sieboldiana*)은 인동과 딱총나무속에 속하고 산지의 습지 및 골짜기에 자라는 갈잎떨기나무이며, 약용식물로 알려져 있다[15]. 그 종류로는 딱총나무, 넓은잎 딱총나무, 털지렁구나무, 지렁구나무, 엘더베리 및 덧나무 등이 있으며, 모두 접골목으로 사용할 수 있다[15]. 접골목은 풍습성관절염, 요통, 골절상 및 위상 출혈에 유효하다고 알려져 있다[16,17]. 또한 산후의 어혈제거 및 타박상, 혈액순환 촉진, 타박상에 의한 부종 및 동통, 두드러기, 피부 가려움증에 쓰이며, 골절 유합 촉진에 현저한 반응을 나타낸다고 알려져 민간요법으로 널리 사용되고 있다[16,17]. 그러나 접골목의 직접적인 골유도 여부에 관해서는 아직 정확히 알려져 있지 않으며, 골을 형성하는 데 중요한 요소인 조골세포의 증식과 분화과정에서 접골목의 생물학적 기능도 명확하게 밝혀지지 않았다.

따라서 본 연구에서는 조골세포로서 생쥐 두개관 조골세포주 MC3T3-E1의 증식과 분화과정에서 접골목에 의한 세포주의 특성변화를 분석하여, 골결손 질환의 치료 및 예방을 위한 천연물 소재개발의 토대를 제공하고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

생쥐 두개관 조골세포주 MC3T3-E1은 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하여 실험에 이용하였다(Fig. 1).

M-MLV reverse transcriptase와 RNasin® plus RNase inhibitor 및 dNTP는 Promega(Madison, WI, USA)에서 구입하였으며, AccuPower® PCR premix는 Bioneer(대전, 대한민국)에서 구입하여 사용하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)는 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, TRI reagent kit는 Molecular Research Center, Inc.(Cincinnati, OH, USA)에서 구입하여 사용하였다. Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green qRT-PCR master mix는 Agilent Technologies(Santa Clara, CA, USA)에서 구입하였으며, Von kossa 염색을 위한 Silver staining kit acc. to von Kossa와 Nuclear fast red-aluminum sulfate solution은 Merck KGaA(Darmstadt, Germany)에서 구입하여 사용하였다.

2. 접골목 에탄올 추출

건조된 접골목(*Sambucus sieboldiana*)을 Jeonnam Herbal Medicine Farmer's Cooperative(전남, 대한민국)에서 구입하여, 흐르는 물을 이용하여 불순물을 제거한 다음 분쇄하였다. 분쇄한 후 10배의 95% 에탄올을 이용하여 실온에서 24시간 동안 침지하여 추출하였다. 추출물은 Advantec No. 2 여과지를 이용하여 여과한 후, rotary

evaporator(N-1000V-W, EYELA, Japan)를 이용하여 감압 농축하였다. 농축된 추출물을 -40°C 에서 3일 동안 동결건조 하였으며, 2°C 에서 보관하며 본 실험의 시료로 사용하였다.

3. 세포배양

생쥐 두개관 조골세포주 MC3T3-E1은 10% fetal bovine serum(FBS, Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) 및 항생제(100u/ml penicillin, $100\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin)가 함유된 37°C 의 alpha-minimum essential medium(α -MEM, Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) 성장배지 하에서 배양하면서 실험에 이용하였다. 세포분화와 석회화유도를 위하여 세포가 배양접시에서 충분히 자란 후, 동일배지에 ascorbic acid($50\mu\text{l}/\text{ml}$)와 β -glycerophosphate(10mM)를 첨가하여 배양하였다[18,19].

4. MTT 분석에 의한 세포증식 측정

접골목에 의한 생쥐 두개관 조골세포주 MC3T3-E1의 세포증식 효과를 관찰하기 위해, 24well plate에 4×10^4 cells/well의 MC3T3-E1 세포를 접종하였으며, 37°C 의 CO_2 배양기에서 24시간 배양한 후 새로운 배양배지로 교체하였다. 접골목 추출물 1 ~ $300\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 첨가하여 24시간 동안 배양하였으며, 세포증식 효과를 MTT 분석으로 측정하였다. MTT 분석은 접골목 추출물을 처리한 MC3T3-E1 세포에 MTT 용액(MTT 최종농도 $0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$)을 37°C 에서 4시간 처리한 후, MTT 용액을 제거하고 0.04N HCl이 함유된 isopropanol로 녹여내어 570nm에서 흡광도를 측정하여 시행하였다[20].

5. Von Kossa 염색을 통한 골기질 형성 분석

조골세포주 MC3T3-E1의 석회화 결절을 확인하기 위하여 Von Kossa 염색을 시행하였다. 분화유도를 위하여 ascorbic acid(50 μ l/ml)와 β -glycerophosphate(10mM)를 첨가하고, 접골목 추출물을 처리한 각 실험군의 MC3T3-E1 세포를 PBS로 3회 세척한 후, 70% ethanol을 이용하여 10분간 고정하였다. 증류수로 세척한 후, 5% AgNO₃를 처리하여 30분간 암실에 보관하였으며, 증류수를 이용하여 수회 세척하였다. 각 실험군의 MC3T3-E1 세포주에 자외선을 15분간 조사한 후, NaHCO₃/formalin 완충액에 7분간 반응시켰으며, 5% Na₂S₂O₃로 여분의 AgNO₃를 중화시켰다. 각 실험군에 nuclear fast red 색소를 5분간 반응시켰으며, 증류수를 이용하여 수회 세척한 후 색의 변화를 관찰하였다. MC3T3-E1 세포주의 분화유무를 확인하여 위하여 분화배지를 포함하지 않은 대조군을 함께 관찰하였다.

6. 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR) 분석

접골목 추출물을 처리하고 세포분화와 석회화가 유도된 각 실험군의 MC3T3-E1 세포주에서 TRI reagent kit(Molecular Research Center, Inc., Ohio, USA)를 이용하여 total RNA를 추출한 후, 자외선 분광기(UV spectrometer)를 이용하여 260nm에서 흡광도를 측정, 추출된 RNA의 농도를 계산하였다. cDNA를 합성하기 위하여 5 μ g의 total RNA를 reverse-transcriptase(Promega, Madison, WI, USA)와 oligo(dT) primer를 이용하여 42 $^{\circ}$ C에서 60분간 역전사 반응을 시행하였다. 합성된 cDNA를 alkaline phosphatase(ALP), osteonectin(ON) 및 osteocalcin(OC) 등의 primer(Table 1)를 이용하여 중합효소연쇄반응(PCR)을 시행하였다. PCR 반응 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 5분, 변성(denaturation)반응을 94 $^{\circ}$ C에서 15초, 결합(annealing)반응을 50~55 $^{\circ}$ C에서 30초, 중합

(extension)반응을 72°C에서 30초간 30주기를 반복하고, 마지막 중합반응은 72°C에서 10분간 연장하여 반응시켰다. 각 primer의 T_m 값을 고려하여 ON과 GAPDH의 결합반응 온도는 55°C, ALP와 OC의 결합반응 온도는 50°C로 시행하였다. RT-PCR 후 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 각각의 PCR product를 확인하였다.

7. 정량 PCR 분석

세포분화와 석회화가 유도된 각 실험군의 MC3T3-E1 세포주에서 OC의 mRNA 발현을 정량 PCR 분석으로 재확인하였다. Brilliant III Ultra-Fast SYBR[®] Green qRT-PCR master mix(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 cDNA 1 μ g, 2X SYBR Green master mix 10 μ l, 각 primer 1 μ l, 100mM DTT 0.2 μ l 및 RT/RNase block 1 μ l를 혼합한 후, 전체 부피가 20 μ l가 되도록 DEPC를 처리한 물로 적정하였다. Exicycler[™] 96(Bioneer co., Daejeon, Korea)을 이용하여 95°C에서 15분간 반응시킨 후, 94°C에서 15초, 55°C에서 30초, 70°C에서 30초를 45회 반복하여 반응시켰다. 정량 PCR 결과를 qcalculator 1.0 program(Institute of Pharmacology & Toxicology, University of Bonn, Bonn, Germany)을 이용하여 Ct 값에 따른 mRNA 양을 정량적으로 계산하여 분석하였다. 정량을 위한 내부 대조군(internal control)으로는 GAPDH를 이용하였으며, 정량 PCR 분석에 사용한 OC primer sequence는 RT-PCR에서의 경우와 동일한 것을 사용하였다.

8. 실험자료의 통계학적 검정

모든 실험성적은 mean \pm SEM으로 나타내었고, 각 실험군 간의 유의성 검정은

ANOVA 후에 Student's t-test를 하였으며, p value가 0.05 미만($p < 0.05$)의 경우에서 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

Table 1. Primer sequences for PCR

Primer Names	Sequence (5'→3')	PCR Product (bp)
ALP (sense)	CTCTCCGAGATGGTGGAGGT	430
ALP (antisense)	GTCTTCTCCACCGTGGGTCT	
ON (sense)	ACGGCCATACCTACAGCTCT	268
ON (antisense)	AACCAGTCACGGAGCCTATC	
OC (sense)	CCACAGCCTTCATGTCCAAG	173
OC (antisense)	GGCAGAGAGAGAGGACAGGG	
GAPDH (sense)	GGTGCTGAGTATGTCGTGGA	196
GAPDH (antisense)	CAGTTGGTGGTGCAGGATG	

ALP: alkaline phosphatase

ON: osteonectin

OC: osteocalcin

Ⅲ. 실험 결과

1. 접골목 추출물에 의한 MC3T3-E1 세포주 증식 효과

생쥐 두개관 조골세포주 MC3T3-E1 세포주에서 접골목 추출물의 생존 및 증식에 미치는 효과를 알아보기 위해 MTT 분석을 실시하였다. 접골목 추출물 1~300 μ g/ml을 24시간 처리한 결과, 접골목 추출물은 MC3T3-E1 세포주의 증식에 영향을 주지 않았으나, 가장 고농도인 300 μ g/ml에서는 MC3T3-E1 세포주의 증식을 약간 감소시키는 경향이 있었다(Fig. 2). 따라서 이후 본 연구에서는 접골목 추출물 100 μ g/ml을 이용하여 MC3T3-E1 세포주 분화에 미치는 여러 가지 효과를 조사하였다.

2. MC3T3-E1 분화과정에서 세포의 기질형성에 미치는 접골목의 효과

생쥐 조골세포주 MC3T3-E1의 세포의 기질형성에 미치는 접골목의 효과를 확인하기 위하여, MC3T3-E1 세포주 분화과정에서 접골목 추출물 100 μ g/ml을 처리한 후 무기질이 침착된 기질을 갈색으로 표현하는 Von Kossa 염색을 시행하였으며, 분화유도를 위하여 ascorbic acid(50 μ l/ml)와 β -glycerophosphate(10mM)를 첨가하였다. 분화유도 10일째에서부터 대조군과 접골목 추출물 처리군에서 세포의 기질형성이 일어나기 시작하였으며, 분화유도 15일째까지는 대조군과 접골목 추출물 처리군에서 세포의 기질형성의 뚜렷한 차이는 없었다(Fig. 3). 그러나 분화유도 20일째와 21일째는 대조군에 비해 접골목 추출물 처리군에서 세포의 기질형성의 뚜렷한 증가를 확인할 수 있었다(Fig. 3).

3. 조골세포주 분화과정에서 분화 특이유전자들의 발현에 미치는 접골목의 효과

생쥐 조골세포주 MC3T3-E1에 ascorbic acid와 β -glycerophosphate를 첨가하여 석회화 결절의 형성을 유도한 배양과정에서 접골목의 효과를 분석하기 위해, MC3T3-E1 세포주 분화과정에서 접골목 추출물 100 μ g/ml을 처리한 후 ALP, ON 및 OC 각각의 primer(Table 1)를 이용하여 RT-PCR을 시행하였다.

ALP mRNA의 발현은 MC3T3-E1 세포주의 분화유도 과정에서 증가하였다(Fig. 4). 대조군에서는 배양 7일째에 배양 0일째보다 6.66배의 ALP mRNA 발현을 보이기 시작하였으며, 15일째에서는 4.82배, 20일째에서는 5.14배의 ALP mRNA 발현을 관찰할 수 있었다(Fig. 4). 접골목 추출물 처리군에서는 7일째에 배양 0일째보다 12.51배의 ALP mRNA 발현을 보였고, 15일째에서는 11.90배, 20일째에서는 10.73배의 ALP mRNA 발현을 관찰할 수 있었으며, ALP mRNA의 발현이 대조군에 비해 약 2배 정도 증가함을 확인할 수 있었다. 본 연구의 결과로 MC3T3-E1 세포주의 분화유도 과정에서 접골목은 ALP mRNA의 발현을 증가시킴을 알 수 있었다(Fig. 4).

본 연구에서 MC3T3-E1 세포주에서 분화를 유도한 후 ON mRNA의 발현이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 5). 대조군에서 ON은 배양 7일째에서 배양 0일째보다 0.77배의 발현을 보였으며, 15일째에서 0.78배, 20일째에서는 0.80배로 발현이 감소하였다(Fig. 5). 접골목 추출물 처리군에서는 배양 7일째에 배양 0일째보다 0.70배의 ON mRNA 발현을 보였고, 15일째에서 0.45배, 20일째에서는 0.12배로 발현이 감소하여 분화유도 시간이 경과할수록 ON mRNA의 발현이 감소함을 확인할 수 있었다. 본 연구의 결과로 MC3T3-E1 세포주의 분화유도 과정에서 접골목은 ON mRNA의 발현을 감소시킴을 알 수 있었다(Fig. 5).

OC mRNA의 발현은 MC3T3-E1 세포주의 분화유도 과정에서 증가하였다(Fig. 6). 대조군에서는 배양 7일째에 배양 0일째보다 1.21배의 OC mRNA 발현을 보이기 시작

하였으며, 15일째에서는 1.25배, 20일째에서는 1.18배의 OC mRNA 발현을 관찰할 수 있었다(Fig. 6). 접골목 추출물 처리군에서는 7일째에 배양 0일째보다 2.20배의 OC mRNA 발현을 보였고, 15일째에서는 1.95배, 20일째에서는 1.52배의 OC mRNA 발현을 관찰할 수 있었으며, OC mRNA의 발현이 배양 7일째에는 대조군에 비해 약 2배 정도 증가함을 확인할 수 있었다. 본 연구의 결과로 MC3T3-E1 세포주의 분화유도 과정에서 접골목은 OC mRNA의 발현을 증가시킴을 알 수 있었다(Fig. 6).

4. 조골세포주 분화과정에서 정량 PCR에 의한 분화 특이유전자들의 발현분석

세포분화와 석회화가 유도된 각 실험군의 MC3T3-E1 세포주에서 OC의 mRNA 발현을 정량 PCR 분석으로 재확인하기 위해, MC3T3-E1 세포주 분화과정에서 접골목 추출물 100 μ g/m을 처리한 후 OC primer를 이용하여 정량 PCR을 시행하였다. RT-PCR 결과에서 OC mRNA의 발현이 가장 많았으며 대조군과 가장 차이가 컸던 배양 7일째에서의 정량 PCR 결과, OC mRNA는 대조군에 비해 접골목 추출물 처리군에서 그 발현이 2.10배 증가하였으며(Fig. 7), 정량 PCR에 의한 mRNA 발현분석 결과는 RT-PCR 분석결과와 일치함을 확인할 수 있었다.

IV. 총괄 및 고안

골을 형성하는 데 관여하는 세포는 조골세포와 파골세포로서, 이 두 세포에 의하여 골 형상이 유지되고 대사되며[1], 조골세포와 파골세포에 의해 새로운 골이 형성되고, 오래된 골은 분해되는 동적인 대사조직으로 두 세포간의 적절한 활성에 의해서 진행된다[2]. 골조직은 주로 수산화인회석(hydroxyapatite)의 결정구조와 아교질, 조골세포에 관여하는 비아교질성 단백질인 오스테오칼신, 세포와 골기질 간의 결합을 촉진하는 단백질인 오스테오폰틴, 골기질을 이루는 구조성 단백질인 시알로단백질 및 프로테오글리칸을 포함한 다양한 종류의 세포외 기질 단백질로 구성되어 있다[1,3].

골다공증은 조골세포에서의 골형성 관련 국소인자의 발현저하 및 파골세포에 의한 골흡수 작용의 상대적인 증가에 의해 골밀도가 낮아지는 질환이다[4-7]. 노화과정에서 파골세포 작용의 증가로 인하여 골다공증의 발병율이 증가하며, 특히 여성의 경우 폐경 이후에 에스트로겐 분비감소에 의해 골밀도의 감소 현상이 더욱 심하여 골다공증에 대한 발병률이 남성보다 현저히 높은 것으로 알려져 있어, 이에 대한 연구가 매우 활발히 진행되고 있다[4-7]. 최근 들어 골다공증 치료를 위한 에스트로겐 투여의 여러 부작용을 보완하기 위해, 한약재 및 식품 등 천연물의 활성성분을 이용한 대체 요법의 연구가 활발히 진행되고 있으며[9-13], 골다공증 예방과 치료를 위한 대체요법으로 식물성 에스트로겐(phytoestrogen)의 경구투여 또는 이를 다양 함유하고 있는 식품의 섭취가 시도되고 있다[14]. 접골목(*Sambucus sieboldiana*)은 인동과 딱총나무속에 속하는 갈잎떨기나무이다[15]. 접골목은 풍습성관절염, 요통, 골절상 및 외상 출혈에 유효하다고 알려져 있으며, 특히 골절 유합 촉진에 현저한 반응을 나타낸다고 알려져 있음에도 불구하고, 조골세포의 증식과 분화과정에서 접골목의 분자생물학적 기전은 아직까지 명확히 밝혀져 있지 않다[16-17]. 따라서 본 연구에서는 조골세포의 증식 및 분화과정

에서 접골목의 효과를 밝히기 위해, 생쥐 두개관 조골세포주 MC3T3-E1에서 분화유도와 접골목 추출물을 처리한 후, MC3T3-E1 세포주의 특성변화를 분석하였다.

조골세포주 MC3T3-E1 세포주에서 접골목 추출물의 생존 및 증식에 미치는 효과를 알아보기 위한 MTT 분석 결과, 본 연구에서 시험한 농도(1~300 μ g/ml)의 접골목 추출물은 MC3T3-E1 세포주의 증식에 영향을 주지 않았다(Fig. 2). 성장호르몬(growth hormone, GH), insulin like growth factor-I(IGF-I) 및 transforming growth factor- β (TGF- β) 등은 조골세포의 증식을 촉진하여 뼈의 성장을 촉진하는 성장인자로 알려져 있으며[21,22], platelet derived growth factor(PDGF)와 fibroblast growth factor(FGF) 같은 성장인자들은 뼈의 세포외 기질에 저장되어 골의 미세환경에서 조상세포들(progenitors)의 증식을 촉진하는 국소기전을 제공한다고 알려져 있다[21-23]. 한편 bone morphogenic protein(BMP)의 골 유도효과(osteoinductive effect)는 매우 다양하여 BMP의 아형이나 골조상세포의 표현형에 따라 각각 그 기능이 다르게 나타난다[24]. 본 연구에서 접골목 추출물은 MC3T3-E1 세포주의 증식에 영향을 주지 않았으며, 이 결과는 접골목 추출물이 조골세포의 성장과 증식에는 영향을 주지 않음을 시사한다.

본 연구에서 분화중인 조골세포주 MC3T3-E1의 세포외 기질형성에 미치는 접골목의 효과를 확인하기 위하여, MC3T3-E1 세포주 분화과정에서 접골목 추출물을 처리한 후 무기질이 침착된 기질을 갈색으로 표현하는 Von Kossa 염색을 시행하였다. 분화유도 10일째에서부터 대조군과 접골목 추출물 처리군에서 석회화 결절형성이 일어나기 시작하였으며, 분화유도 20일째와 21일째는 대조군에 비해 접골목 추출물 처리군에서 석회화 결절의 뚜렷한 증가를 확인할 수 있었다(Fig. 3). 본 연구의 결과는 접골목 추출물이 조골세포주 MC3T3-E1의 성장과 증식에는 영향을 주지 않으면서, 분화유도 과정에서 조골세포주의 분화를 직접적으로 촉진시킬 수 있음을 시사하고 있다.

MC3T3-E1 세포주의 분화과정에서 조골세포 활성을 알아보는 표지자로 ALP의 활

성을 측정함으로써 접골목 추출물의 조골세포 활성화에 미치는 영향을 관찰한 결과, ALP mRNA의 발현은 MC3T3-E1 세포주의 분화유도 과정에서 증가하였으며, 접골목 추출물은 ALP mRNA의 발현을 더욱 증가시켰다(Fig. 4). 특히 분화유도 초기인 분화 7일째에 ALP mRNA의 발현이 가장 많았다. ALP는 골조직에서 골성장이 활발할 때 그 활성이 더욱 증가한다는 선행연구들[25,26]의 결과를 보아, 본 연구에서 접골목 추출물이 조골세포 분화과정 중에서 골결절 형성의 초기에 도움을 줄 것으로 예상되며, 증가된 ALP 합성은 세포의 기질에 calcium phosphate를 침착시켜 골형성 역할을 함으로써 석회화를 유도하여 조골세포의 분화와 성숙에 중요기능을 담당할 것으로 생각된다[25,26].

본 연구에서 MC3T3-E1 세포주 분화과정에서 ON mRNA의 발현이 감소하였으며, 특히 접골목 추출물 처리군에서는 석회화 결절이 형성되면서 ON mRNA의 발현이 더욱 감소하였다(Fig. 5). ON은 비교원성 성분으로 세포와 세포의 기질과의 상호작용을 조절하고 세포의 기질과 부착을 억제하는 당단백질로 알려져 있으며, 성장인자 활동성의 조절기능과 세포주기 억제 기능이 있다고 알려져 있다[27-29]. 본 연구에서 ON mRNA 발현이 감소하는 결과는 MC3T3-E1 세포주의 분화과정에서 접골목은 세포의 기질과 부착을 억제하는 당단백질인 ON mRNA의 발현을 감소시켜 석회화 결절 형성을 촉진시킴을 시사한다.

OC mRNA의 발현은 RT-PCR(Fig. 6)과 정량 PCR(Fig. 7) 결과에서 MC3T3-E1 세포주 분화유도 과정 중 증가하였으며, 접골목 추출물은 OC mRNA의 발현을 더욱 증가시켰으나, ALP에 비교해서는 크게 증가하지 않았다. 특히 ALP의 경우에서와 유사하게 분화유도 초기인 분화 7일째에 OC mRNA의 발현이 가장 많았다. OC는 골형성의 생화학적 표지자로서 조골세포에서 합성되며, 비교원성 단백질로 혈중 농도가 골형성 여부를 확인할 수 있는 요소이다[30]. 또한 OC는 골이나 상아질 및 석회화된 연골에서 발현되는 특이적인 유전자로서, OC의 발현은 골이 석회화되어 결절을 형성하

는 시기와 일치하며, 이는 석회화를 촉진시키는 요인으로 작용한다[31]. 본 연구의 결과로 보아 접골목 추출물은 조골세포 분화과정 중 골결절 형성의 초기에 도움을 줄 것으로 예상되며, 증가된 OC는 조골세포 석회화를 촉진시키는 요인으로 작용할 것으로 생각된다. 그러나 조골세포 분화의 분자적인 기전과 접골목 추출물의 효과에 대한 세포 및 분자적 기전연구는 더 추구하여야 할 과제로 생각된다.

결론적으로, 본 연구의 결과로 생쥐 두개관 조골세포주 MC3T3-E1 세포주 분화과정에서 접골목 추출물이 조골세포 분화를 촉진시킬 수 있음을 알 수 있었다. 또한 본 실험의 결과로, 골결손 질환 및 골재생에 관한 하나의 연구방향을 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

조골세포의 분화과정에서 접골목에 의한 조골세포의 특성변화를 분석하여, 골결손 질환의 치료 및 예방을 위한 천연물 소재개발의 토대를 제공하기 위해, 생쥐 두개관 조골세포주 MC3T3-E1의 증식과 분화과정에서 접골목 추출물을 처리한 후, 식물재료 추출, 세포배양, MTT 분석, Von Kossa 염색을 통한 골기질 형성 분석, RT-PCR 분석 및 정량 PCR 분석을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 접골목 추출물은 MC3T3-E1 세포주의 증식에 영향을 주지 않았다.
2. MC3T3-E1 세포주의 분화유도 과정에서 시간이 경과할수록 대조군에 비해 접골목 추출물 처리군에서 세포외 기질현상이 뚜렷하였다.
3. MC3T3-E1 세포주의 분화유도 과정에서 접골목 추출물은 ALP mRNA의 발현을 증가시켰다.
4. MC3T3-E1 세포주의 분화유도 과정에서 접골목 추출물은 ON mRNA의 발현을 감소시켰다.
5. MC3T3-E1 세포주의 분화유도 과정에서 접골목 추출물은 OC mRNA의 발현을 증가시켰다.

본 연구의 결과로 생쥐 두개관 조골세포주 MC3T3-E1 세포주 분화과정에서 접골목 추출물이 조골세포 분화를 촉진시킬 수 있음을 알 수 있었다. 또한 본 실험의 결과로, 골결손 질환 및 골재생에 관한 하나의 연구방향을 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

VI. 참고 문헌

1. Berg C, Neumeyer K, Kirkpatrick P. Teriparatide. *Nat Rev Drug Discov* 2, 2003;160:257-8.
2. Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 2000;289:1501-4.
3. Suda T, Takahashi N, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev* 1992;13:66-80.
4. Duda RJ, O'Brien JF, Ksxlmsnn JA. Concurrent assays of circulating bone-gla protein and alkaline phosphate: Effect of sex, age, and metabolic bone disease. *J Clin Endocr Meta* 1998;66:951-7.
5. Mohan S, Baylink DJ. Bone growth factors. *Clin Orthop Relat Res* 1991;263: 30-48.
6. Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 2003;423:349-55.
7. Paik MK, Lee HO, Chung HS, Yang SO, Om AS. Genistein may prevent cadmium-induced bone loss in ovariectomized rats. *JMF* 2003;6:337-43.

8. Bowles SA, Kurdy N, Davis AM, France MW, Marsh DR. Serum osteocalcin, total and bone-specific alkaline phosphatase following isolated tibial shaft fracture. *Ann Clin Biochem* 1996;33:196-200.
9. Anderson JJ, Garner SC. Phytoestrogens and bone. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1998;12:543-57.
10. Lee HK. Effect of black bean and *samryungbakchulsan* on ovariectomy-induced postmenopausal osteoporotic rats. Ph.D. thesis. Kyung Hee University, Seoul, Korea, 1998.
11. Setchell KD, Cassidy A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nutr* 1999;129:758-67.
12. Ho JY. Cell proliferation effects of *Eucommiae* and *Acanthopanax* methanol extracts on the osteoblastlike cell line, MG-63 and Saos-2. Ph.D. thesis. Kyung Hee University, Seoul, Korea, 2001.
13. Lim SY, Leem JY, Lee CS, Jang YJ, Park JW, Yoon S. Antioxidant and cell proliferation effects of *acanthopanax senticosus* for extract in human osteoblast-like MG-63 cell line. *Korean J Food Sci Technol* 2007;39:694-700. (Korean)

14. Um SJ, Kang IS, Cho Y. Study on the role of estrogen receptor α in yak-kong and soybean induced proliferation of MG-63 human osteoblastic cells. Korean J Nutr 2005;38:512-20. (Korean)
15. Park JH, Keon AK, Do WI. Pharmacognostical studies on the "Jeob Gol Mog". Kor J Pharmacon 2006;37:120-3. (Korean)
16. Shi XC. Chinese-English Terminology of Traditional Chinese Medicine. Hunan Science Publishing Co., China, pp. 71 - 8, 1983.
17. Lee DG, Kim EJ, Lee ES, Wang KH, Cho HS, Lee SD, Kim KS, Kim KH. Effect of suppressing the activation of macrophage migration inhibitory factor by *Sambucus williamsii* HANCE extract and pharmacopuncture solution on type II collagen-induced arthritis. J Kor Acupunct Moxibust Soc 2012;29:103-13. (Korean)
18. Nakano Y, Addison WN, Kaartinen MT. ATP-mediated mineralization of MC3T3-E1 osteoblast cultures. Bone 2007;41:549-61.
19. Al-Jallad HF, Nakano Y, Chen JLY, McMillan E, Lefebvre C, Kaartinen MT. Transglutaminase activity regulates osteoblast differentiation and matrix mineralization in MC3T3-E1 osteoblast cultures. Matrix Biol 2006;25:135-48.

20. Kim SY, Kim SG, Oh JS, Cha YJ, Moon YH, Kim DK. Anticancer effects of quercetin on KB human oral cancer cells. *Oral Biol Res* 2012;36:113-22.
21. Verhaar HJ, Damen CA, Duursma SA, Scheven BA. A comparison of the action of progestins and estrogen on the growth and differentiation of normal adult human osteoblast-like cells *in vitro*. *Bone* 1994;15:307-11.
22. Kassem M, Mosekilde L, Eriksen EF. Growth hormon stimulates proliferation of normal human bone marrow stromal osteoblast precursor cells *in vitro*. *Growth Regul* 1994;4:131-5.
23. Choi EM, Suh KS, Kim YS, Choue RW, Koo SJ. Soybean ethanol extract increases the function of osteo-blastic MC3T3-E1 cells. *Phytochemistry* 2001;56:733-9.
24. Moseley JM, Martin TJ. Parathyroid hormone-related protein: Physiological actions. In "Principles of Bone Biology"(J. P. Bilezikian, L. G. Raisz, and G. A. Rodan, eds.), pp. 363-76, Academic Press, San Diego, CA, 1996.
25. Broskey AL. Non-collagen matrix proteins and their role in mineralization. *Bone Miner* 1992;6:111-23.
26. Bellow CG, Aubin JE, Heersche JNM. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed *in vitro*: The role of alkaline phosphate and organic phosphate. *Bone Miner* 1991;14:27-40.

27. Gilmour DT, Lyon GJ, Carlton MB, Sanes JR, Cunningham JM, Anderson JR, Hogan BL, Evans MJ, Colledge WH. Mice deficient for the secreted glycoprotein SPARC/osteonectin/BM40 develop normally but show severe age-onset cataract formation and disruption of the lens. *EMBO J* 1998;17:1860-70.
28. Brekken RA, Puolakkainen P, Graves DC, Workman G, Lubkin SR, Sage EH. Enhanced growth of tumors in SPARC null mice is associated with changes in the ECM. *J Clin Invest* 2003;111:487-95.
29. Kim YW, Park YK, Lee J, Ko SW, Yang MH. Expression of osteopontin and osteonectin in breast cancer. *J Korean Med Sci* 1998;13:652-7.
30. Safadi FF, Xu J, Smock SL. Expression of connective tissue growth factor in bone: its role in osteoblast proliferation and differentiation *in vitro* and bone formation *in vivo*. *J Cell Physiol* 2003;196:51-60.
31. Hauschka PV, Lian JB, Cole DEC, Gundberg CM. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev* 1989;69:990-1047.

VII. 사진부도 설명

Fig. 1. Microphotographs show MC3T3-E1 mouse osteoblastic cells; A ($\times 40$), B ($\times 100$).

Fig. 2. Concentration-dependent effects of *Sambucus sieboldiana* on the cell proliferation in MC3T3-E1 mouse osteoblastic cells. The MC3T3-E1 cells were treated with various concentrations of *Sambucus sieboldiana* for 24 hours. The cell proliferations were determined by the MTT assays. The percentage of cell proliferation was calculated as a ratio of $A_{570_{nm}}$ of *Sambucus sieboldiana* treated cells and untreated control cells. Each data point represents the mean \pm SEM of three experiments.

Fig. 3. Mineralized nodule formation in MC3T3-E1 cells. The mineralized nodule formation induced by the differentiation media and *Sambucus sieboldiana* was examined after 0, 5, 10, 15, 20 and 21 days of culture. The cells were grown in the presence of ascorbic acid and β -glycerophosphate for inducing the mineralization and were examined the effect of *Sambucus sieboldiana* on mineralized nodule formation. The nodules were detected by Von Kossa staining.

Fig. 4. Effect of *Sambucus sieboldiana* on alkaline phosphatase (ALP) mRNA expression. The first stand cDNAs prepared from the MC3T3-E1 cell total RNAs were used as template for PCR amplification. The PCR products were electrophoresed on a 1.5% agarose gel and visualized with ethidium bromide. *A.* Agarose gel electrophoresis was performed on the RT-PCR products from MC3T3-E1 cells (ALP; 430 bp, GAPDH; 196 bp) (0; 0 day after treatment with differentiation media, 7; 7 days after treatment with differentiation media, 15; 15 days after treatment with differentiation media, 20; 20 days after treatment with differentiation media, Control; treatment with differentiation media only, *Sambucus sieboldiana*; treatment with differentiation media and *Sambucus sieboldiana*) *B.* The percentage of ALP mRNA expression was calculated as a ratio of GAPDH band.

Fig. 5. Effect of *Sambucus sieboldiana* on osteonectin (ON) mRNA expression. *A.* Agarose gel electrophoresis was performed on the RT-PCR products from MC3T3-E1 cells (ON; 173 bp, GAPDH; 196 bp) *B.* The percentage of ON mRNA expression was calculated as a ratio of GAPDH band. Other legends are the same as in Fig. 4.

Fig. 6. Effect of *Sambucus sieboldiana* on osteocalcin (OC) mRNA expression. *A.* Agarose gel electrophoresis was performed on the RT-PCR products from MC3T3-E1 cells (OC; 268 bp, GAPDH; 196 bp) *B.* The percentage of OC mRNA expression was calculated as a ratio of GAPDH band. Other legends are the same as in Fig. 4.

Fig. 7. Effect of *Sambucus sieboldiana* on OC mRNA expression by real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR). The expression level of OC mRNA was calculated by using qcalculator 1.0 program after internal control u6 normalization. Each relative copy number value represents the mean of three independent experiments. The relative expression of OC mRNA was accessed by qRT-PCR according to methods described in 'Materials and Methods'.

VIII. 김정선 사진부도

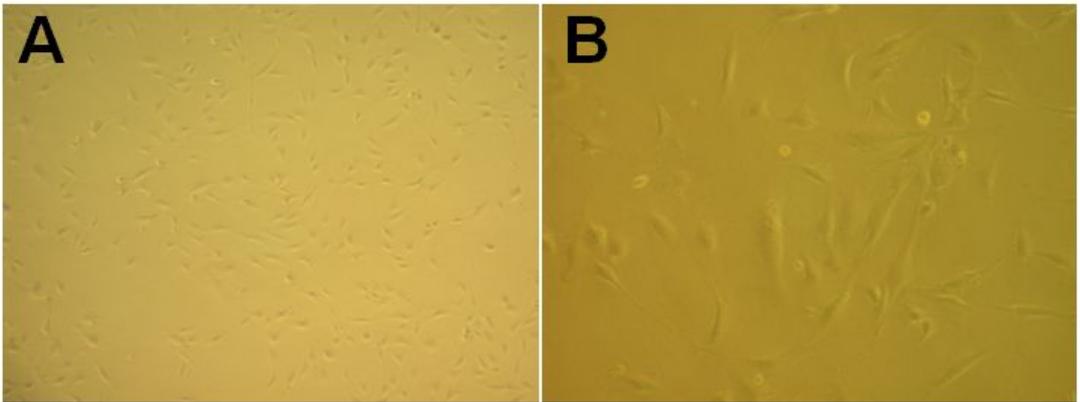


Fig. 1. Microphotographs show MC3T3-E1 mouse osteoblastic cells; A ($\times 40$), B ($\times 100$).

VIII. 김정선 사진부도

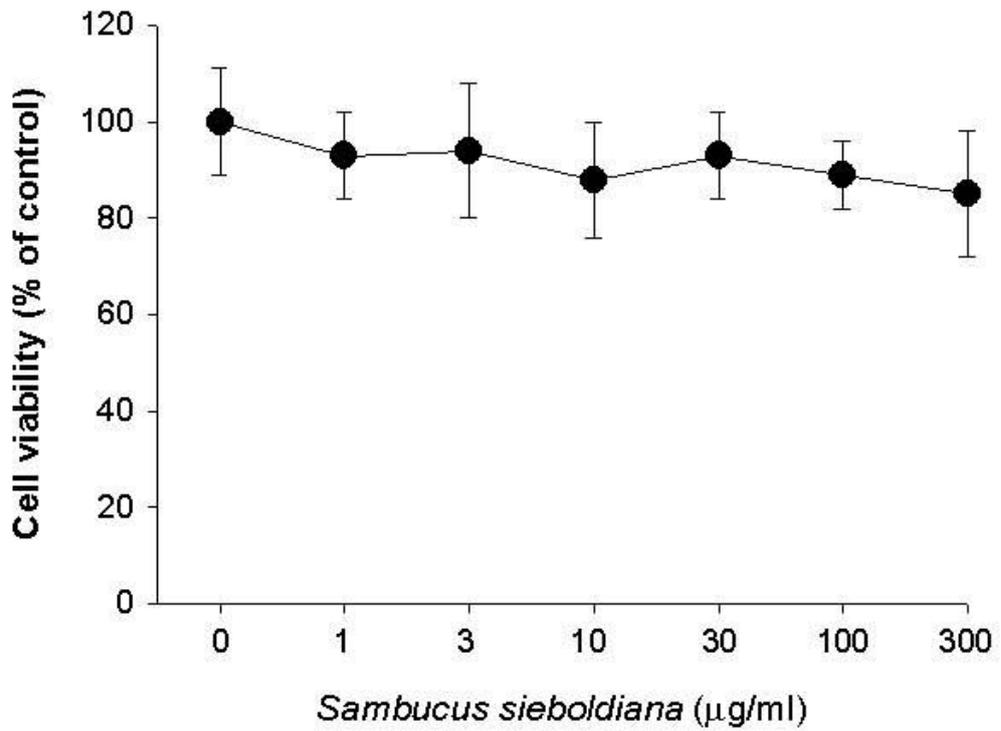


Fig. 2. Concentration-dependent effects of *Sambucus sieboldiana* on the cell proliferation in MC3T3-E1 mouse osteoblastic cells.

VIII. 김정선 사진부도

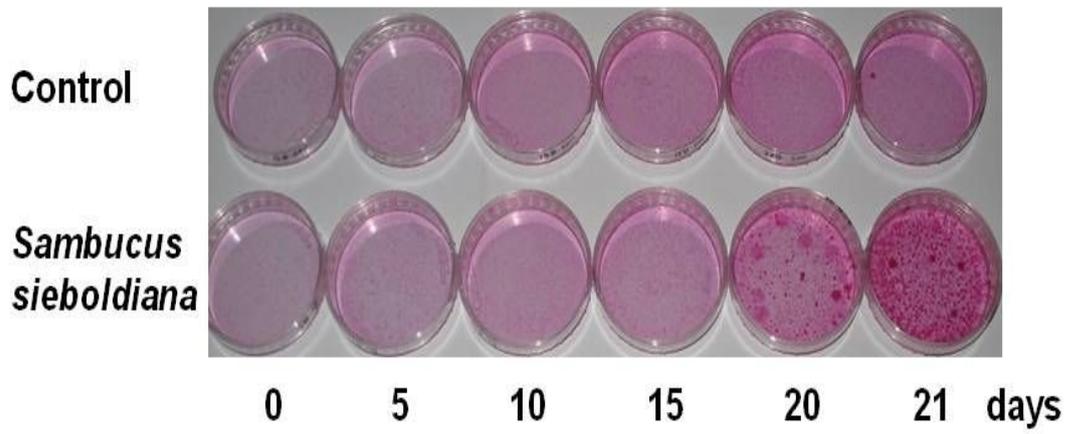


Fig. 3. Mineralized nodule formation in MC3T3-E1 cells.

VIII. 김정선 사진부도

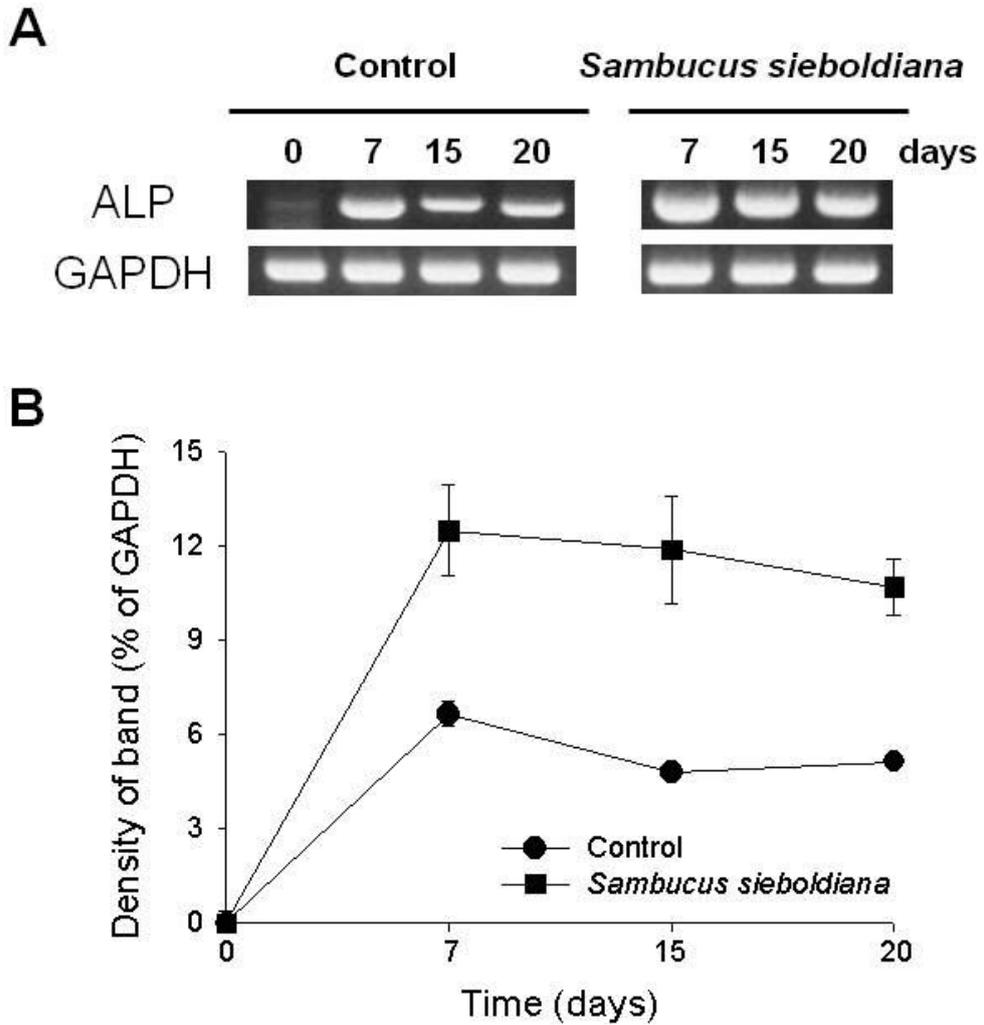


Fig. 4. Effect of *Sambucus sieboldiana* on alkaline phosphatase (ALP) mRNA expression.

VIII. 김정선 사진부도

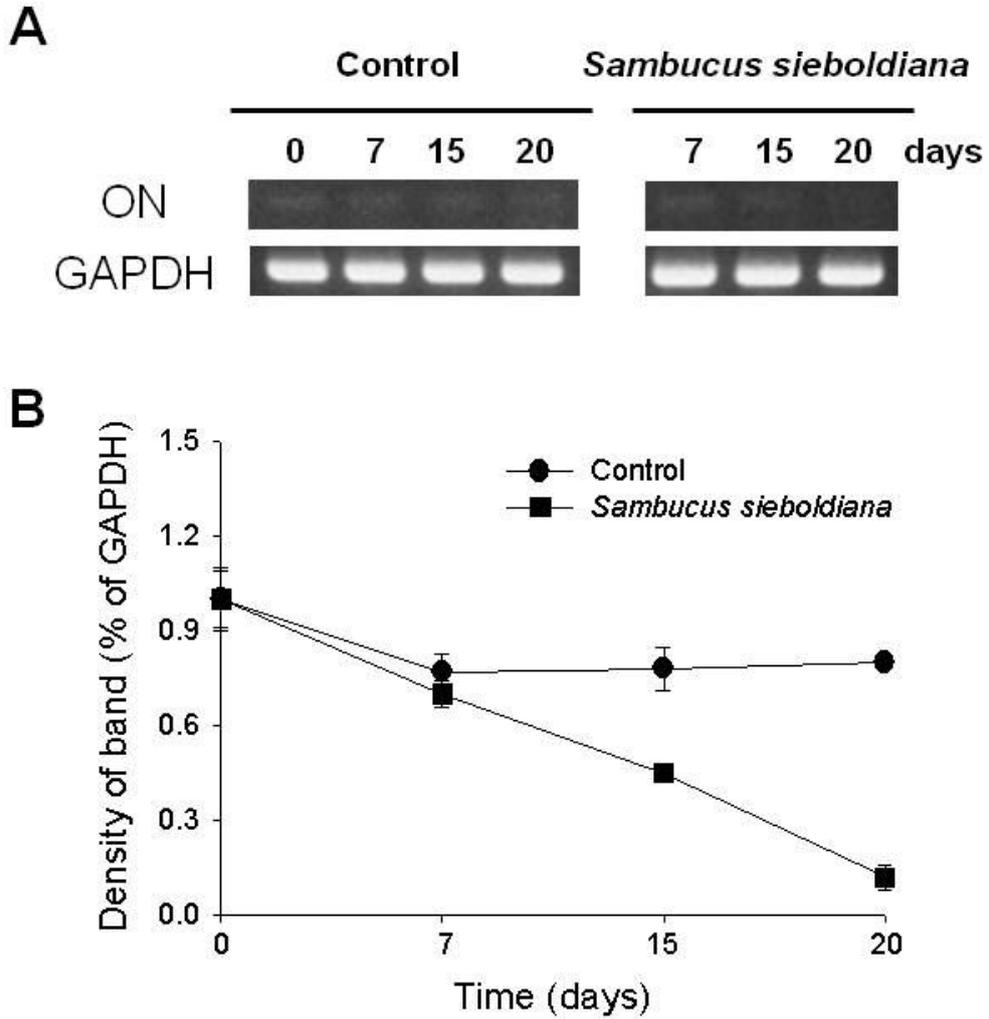


Fig. 5. Effect of *Sambucus sieboldiana* on osteonectin (ON) mRNA expression.

VIII. 김정선 사진부도

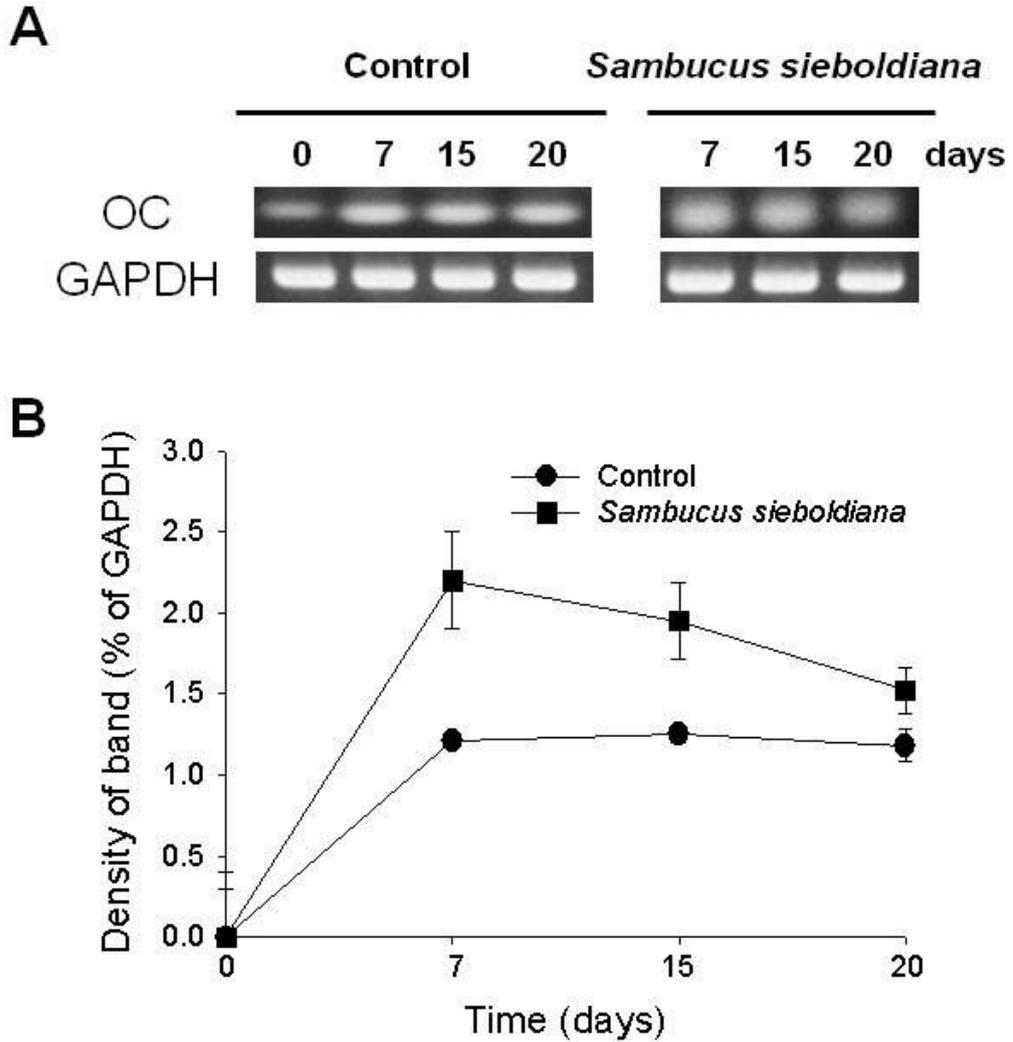


Fig. 6. Effect of *Sambucus sieboldiana* on osteocalcin (OC) mRNA expression.

VIII. 김정선 사진부도

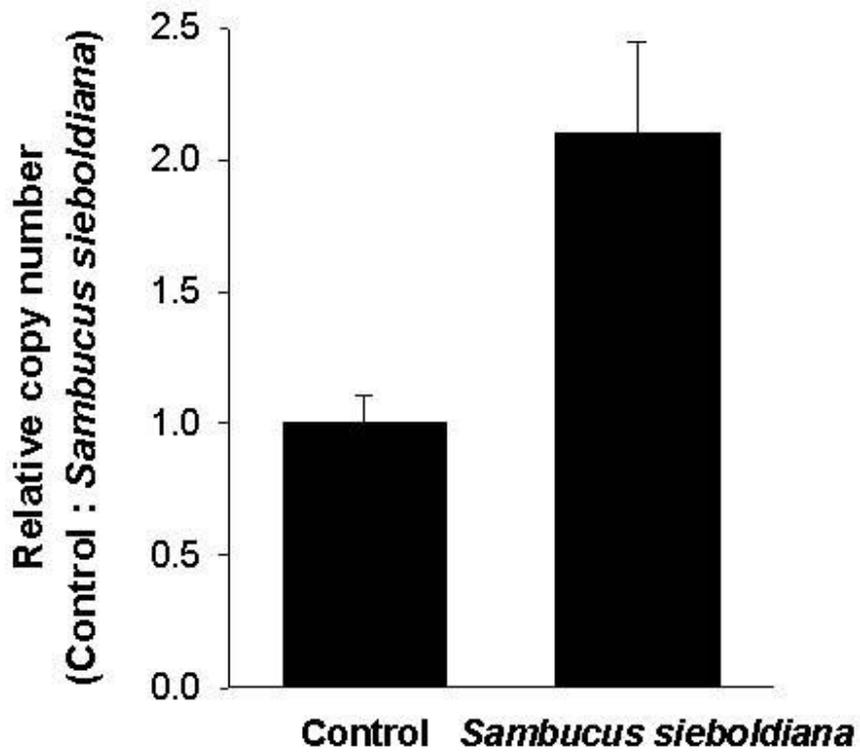


Fig. 7. Effect of *Sambucus sieboldiana* on OC mRNA expression by real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR).